



TITLE:

# Structural studies on the [NiFe] hydrogenase maturation mechanism( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Kwon, Sunghark

---

CITATION:

Kwon, Sunghark. Structural studies on the [NiFe] hydrogenase maturation mechanism. 京都大学, 2018, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20932>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2018-12-31に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博 士 ( 理 学 )	氏名	權 成 鶴 (Sunghark Kwon)
論文題目	Structural studies on the [NiFe] hydrogenase maturation mechanism ([NiFe]ヒドロゲナーゼの成熟化機構に関する構造研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>[NiFe]ヒドロゲナーゼは可逆的な水素代謝反応を触媒する酵素である．タンパク質分子は大サブユニットと小サブユニットから構成されており，大サブユニットに Ni-Fe クラスターを含む活性部位がある．この Ni-Fe クラスターは自発的には形成されず，一連の Hyp タンパク質群 (HypA-HypF) がクラスターの組み込みなどに関わっている．さらに，クラスターが活性部位に導入された後には，HybD, HycI などのプロテアーゼによって大サブユニットの C 末端が切断される．この翻訳後修飾過程は成熟化と呼ばれる．Hyp タンパク質群の一つ，HypA は活性部位への Ni 挿入を担っており，HybD または HycI による C 末端切断にも，Ni による基質認識が必須であることが知られている．</p> <p>しかしながら，どのような機構で HypA が活性部位への Ni 組み込みに働いているか，HybD と HycI のようなプロテアーゼがどのように基質を認識するかについては，よく理解されていない点が多い．本研究では，これらの成熟化機構を明らかにするため，好熱性アーキアである <i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1 由来のヒドロゲナーゼ大サブユニット HyhL と成熟化タンパク質 HypA との複合体，および二つのプロテアーゼ HybD と HycI の結晶構造を決定し，これらの構造と機能に関する研究を行った．</p> <p>HyhL-HypA 複合体は，精製した HyhL と HypA を混合することによって調製し，ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて複合体形成を確認した．複合体の結晶は二つの温度条件から析出し，20℃で得られた空間群 C222 の結晶，4℃で得られた P23 の結晶について，それぞれ 3.24 Å および 3.30 Å 分解能で結晶構造を決定した．結晶構造から，HyhL-HypA 複合体は疎水性相互作用およびβシート形成による水素結合によって相互作用していることが分かった．両者の接触面では，HyhL の Phe44, Ala43, HypA の Ile43, Phe46 などが疎水的に相互作用し，HyhL の N 末端が HypA の Ni 結合ドメインの C 末端ストランドとβシートを形成していた．この複合体では Ni の結合は確認できなかったが，HypA の Ni 結合に関与する残基の His2 と HyhL の活性部位残基の Cys65 の距離は 12.2 Å で，十分に Ni を伝達できることが分かった．</p>			

HypA は、HypB とともに Ni を含む複合体を形成することが知られている。HypA から HyhL への Ni 伝達の機構を明らかにするため、HyhL、HypA、HypB 間の相互作用をゲルろ過クロマトグラフィーで確認した。その結果、HyhL-HypA-HypB の三者複合体は形成されず、また、HypA が HyhL の活性部位に Ni を伝達するためには、HypA-HypB 複合体としてではなく、HypA のみで相互作用することが明らかになった。

成熟化過程を理解するため、成熟化が完了されていない HyhL の構造と成熟化が完了された *Methanothermobacter marburgensis* 由来の[NiFe]ヒドロゲナーゼ大サブユニット FrhA の構造を比較したところ、両者の全体構造は類似しているものの、N 末端および C 末端の位置ならびに二次構造は大きく異なることが分かった。未成熟型 HyhL の N 末端は分子の外側に突き出して HypA の Ni 結合ドメインと相互作用しているのに対して、C 末端は成熟型 FrhA の N 末端と同じ位置にあることが明らかになった。一方、成熟型 FrhA の C 末端は活性部位に位置しておりヘリックス構造を形成していた。これらの構造上の相違は、Ni の活性部位への挿入および C 末端切断の後に構造的な変化が起こることを示唆している。

さらに、成熟化プロテアーゼ HybD および HycI の結晶構造をそれぞれ 1.82 Å, 1.59 Å 分解能で決定した。両者は  $\alpha/\beta/\alpha$  サンドウィッチフォールドで構成されており、成熟化プロテアーゼについてのこれまでの研究で明らかになっているその機能に重要な残基は保存されていることが分かった。また、二つのループ構造の空間の大きさが異なること、その空間表面には疎水性残基が分布していることが観察された。このことに加えて、基質の C 末端アミノ酸配列情報を検討した結果、この空間が基質認識部位になる可能性が示唆された。

このような研究結果に基づいて、Ni-Feクラスターの組み込みならびに成熟化について、[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化の分子機構を提案することができた。

(論文審査の結果の要旨)

[NiFe]ヒドロゲナーゼは、水素の酸化および還元反応を触媒する。タンパク質分子は大小二つのサブユニットからなり、大サブユニットにはNi-Feクラスターを有する活性部位が存在する。その機能発現には、クラスターの組み込みを含む翻訳後修飾が必須である。そのような成熟化の過程では、HypAと呼ばれる成熟化タンパク質がNiを大サブユニットに組み込み、その後、成熟化プロテアーゼが大サブユニットのC末端を切断することが知られている。しかし、成熟化の詳細な分子機構は明らかでない点が多い。本論文は、好熱性アーキア由来の[NiFe]ヒドロゲナーゼ大サブユニットHyhLとHypAとの複合体、および二つのプロテアーゼ HybD, HycI の結晶構造を決定し、その構造情報に基づいて、[NiFe]ヒドロゲナーゼの成熟化過程の分子機構を解明しようとしたものである。

HyhL-HypA複合体では、異なる温度条件から空間群の異なる二種の結晶が得られ、決定されたそれぞれの結晶構造から、HyhLとHypAは疎水性相互作用と $\beta$ シート形成という異なる相互作用で複合体を形成することを明らかにしている。特に、HyhLのN末端がHypAのC末端のストランドと相互作用して $\beta$ シートを形成するという興味深い複合体形成をしており、その変異体実験からはHyhLのN末端がHypA認識に重要な役割をすることを見いだしている。この複合体構造ではNiは確認できなかったが、HyhLとHypA間でNi結合に関与するアミノ酸残基の距離から、Ni伝達が十分に可能であることが示唆された。この複合体構造はC末端切断前の未成熟型大サブユニットの初めての構造であり、未成熟型および成熟型の大サブユニットの構造比較から、全体構造は類似しているにもかかわらず、N末端およびC末端の位置と二次構造が異なっているという特徴を明らかにしている。この相違は活性部位へのNi組み込みおよびC末端切断による構造変化を示唆するもので、[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化機構に新たな視点を与えるものと評価できる。

さらには、成熟化プロテアーゼであるHybDおよびHycIの結晶構造も決定し、二つの疎水的なループ構造が形成する空間の大きさが異なることを見いだしている。二つのループの疎水性領域の大きさを、基質の切断残基の後に存在する疎水性残基の長さに対応させることで、この部位が基質認識部位であると推測しており、この結果はヒドロゲナーゼ成熟化機構に関する議論を深めるものである。

以上のことから、本論文は博士（理学）の学位論文として価値があるものと認める。また、平成30年1月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日：                      年                      月                      日以降